

Efeito do Tempo de Imersão em Solução Crioprotetora e Desidratação na Regeneração de Ápices Caulinares de Jenipapeiro para Criopreservação

Francielen Paola de Sá¹; Ana da Silva Léo²; José Edmário dos Santos³; Milena Mascarenhas de Jesus Ribeiro⁴; Inácio Roque de Andrade Júnior⁵; Fernanda Vidigal Duarte Souza⁶

Resumo

A *Genipa americana* L. é uma planta tropical perene com relevância econômica, social e ambiental na região Nordeste do Brasil. A conservação dos recursos genéticos desta espécie possui grande relevância para os programas de melhoramento e para manutenção da sua diversidade genética. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes tempos de imersão em solução crioprotetora e tempo de desidratação em câmara de fluxo laminar na regeneração de ápices caulinares de *Genipa americana* para fins de conservação a logo prazo. Foram utilizados ápices caulinares encapsulados em alginato de sódio, estes foram imersos por 24 e 48 horas em solução 0,5 M de sacarose e, desidratados por 0, 2 e 4 horas em câmara de fluxo laminar, em seguida foram inoculados no meio de regeneração MS acrescido de 30 g/L de sacarose e 1 mg/L de BAP, gelificado com 4,5 g/L de Phytigel[®]. Aos 30 dias de cultivo foram avaliados o percentual de regeneração, o número de brotos emitidos, o comprimento da maior brotação e o número de folhas/ ápice caulinar de jenipapeiro. A imersão em solução crioprotetora de 0,5 M sacarose e a desidratação em câmara de fluxo laminar não altera a viabilidade dos ápices

¹ Engenheira-florestal, mestrande de Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, francielenpaola@yahoo.com.br.

² Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

³ Graduando de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Sergipe, bolsista do PIBIC da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, edmario_jedes2012@hotmail.com.

⁴ Graduanda de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Sergipe, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, milenarjm@gmail.com.

⁵ Técnico em Química, assistente da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, inacio.andrade@embrapa.br.

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Celular, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, fernanda.souza@embrapa.br.

caulinares de jenipapeiro encapsulados. A imersão por 24 horas em solução crioprotetora de 0,5 M sacarose e desidratação por 2 horas em câmara de fluxo laminar apresenta potencial para uso em futuros trabalhos de criopreservação por encapsulamento-desidratação.

Palavras-chave: Criopreservação, crioprotetor, encapsulamento-desidratação, *Genipa americana*, sacarose.

Introdução

Genipa americana L. pertence à família Rubiaceae, é uma essência florestal nativa da América do sul e central, popularmente conhecida como jenipapeiro. Esta espécie apresenta relevância socioeconômica e ambiental, devido seus atributos madeireiros, medicinais, cosméticos, e alimentícios. Além disso, é uma espécie tolerante a áreas inundadas, sendo assim indicada para compor áreas preservação permanente (LORENZI, 1992) e, devido sua rusticidade, abundante produção de sementes e produção de frutos atrativos para fauna é recomendada para recuperar áreas degradadas (VALERI, 2003).

As sementes do jenipapeiro são classificadas como intermediárias, ou seja, suportam a desidratação entre 7 e 10% do teor de água e não toleram baixas temperaturas durante períodos prolongados (CARVALHO, 2003), portanto a conservação em banco de sementes não é indicada. Desta forma, sua conservação ocorre predominantemente por meio de coleções de campo, nas quais necessitam de grande área de cultivo, altos custos de manutenção (poda, controle de pragas, propagação e fertilização), elevada suscetibilidade a perda por ataque de patógenos, falhas na identificação ou erros humanos, além do vandalismo e intempéries climáticas (ENGELMANN, 1991; STUSHNOFF, 1987).

Sendo assim, a criopreservação surgiu como uma técnica promissora para conservação a longo prazo desta espécie, além de ser um método complementar aos métodos convencionais de conservação. A criopreservação consiste na manutenção dos explantes vegetais (embriões somáticos e zigóticos, pólen, sementes, ápices e gemas, nós cotiledonares, células em suspensão e protoplastos) em temperatura ultra baixas fornecidas pelo nitrogênio líquido (-196° C) ou em sua fase de vapor (-150° C) (SANTOS, 2000), nestas temperaturas a movimentação de moléculas é reduzida paralisando temporariamente o metabolismo vegetal.

Diferentes métodos de criopreservação tem surgido para assegurar a viabilidade das células após a exposição a temperaturas ultra-baixas. A desidratação é uma etapa comum a todos os procedimentos de criopreservação, na qual visa preparar a estrutura vegetal a ser criopreservada, a fim de evitar danos causados pela cristalização da água intracelular (VIEIRA, 2000). A desidratação pode ser promovida pelo uso de crioprotetores ou pelo uso da câmara de fluxo laminar ou sílica gel que induzem a evaporação da água intra e extracelular.

Uma das técnicas de criopreservação é denominada de encapsulamento-desidratação que consiste na tecnologia de sementes sintéticas, no qual o material vegetal (explantes de 3 a 5 mm) é envolvido em solução de alginato de sódio seguido da desidratação promovida por crioprotetores, tais como a solução de sacarose em altas concentrações (0,3 a 1,5 M), seguido do uso da câmara de fluxo laminar ou sílica gel, após o rápido congelamento dos explantes em nitrogênio líquido (VIEIRA, 2000).

Apesar das potencialidades de uso do jenipapeiro não existem protocolos de criopreservação para esta espécie, desta forma estudos preliminares tornam-se prioritários. Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes tempos de imersão em solução crioprotetora e tempo de desidratação em câmara de fluxo laminar na regeneração de ápices caulinares de *Genipa americana* para fins de conservação a logo prazo.

Material e Métodos

Plantas matrizes de jenipapeiro germinadas *in vitro* do acesso Oiteiros (OIT) foram cultivadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado 30 g/L de sacarose, 4,5 g/L de Phytigel®, com pH ajustado para $5,8 \pm 1$ e autoclavado por 20 minutos a $121 \pm 1^\circ \text{C}$ e pressão de 1,05 atm. Após quatro meses de cultivo, a partir daquelas plantas matrizes foram excisados ápices caulinares de aproximadamente 5 mm de comprimento e imersos em 100 ml do meio de cultura MS acrescido da solução de alginato de sódio 3% (m/v) e 2% de viscosidade, conforme metodologia de Soliman (2013). Em seguida, com auxílio da pipeta de Pasteur os explantes foram succionados e depositados na solução de 100 mM de cloreto de Cálcio (CaCl_2) por 20 minutos, sob agitação, a fim de promover a polimerização das cápsulas contendo os explantes. Posteriormente, os encapsulados foram transferidos para meio MS líquido suplementado com 0,5 M de sacarose,

sob agitação a 100 rpm, onde permaneceram por 24 e 48 horas a $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ na ausência de luz.

Em câmara de fluxo laminar, as gemas encapsuladas foram colocadas em placas de Petri sobre papel filtro para retirada do excesso do meio de cultura e, desidratadas por diferentes períodos: 0, 2 e 4 horas em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Os ápices caulinares encapsulados foram inoculados diretamente em meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 1 mg/L BAP e 4,5 g/L Phytigel® e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$, umidade relativa do ar média em torno de 70%, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Ao final da quarta semana após inoculação no meio de cultura, os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de regeneração considerando o número de brotos emitidos por explante, comprimento do maior broto e número de folhas por ápice caulinar.

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×3 (2 tempos de imersão nas soluções crioprotetoras \times 3 tempos de desidratação), com 4 repetições, sendo cada parcela composta por 3 ápices caulinares. As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância e foram ajustadas equações de regressão polinomial utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância (Tabela1) houve efeito do tempo de imersão na solução crioprotetora (I) para o número de brotos emitidos, comprimento da maior brotação e número de folhas/ ápice caulinar e do tempo de desidratação (D) em câmara de fluxo para número de brotos emitidos e número de folhas/ápice caulinar. Não houve efeito da interação dos fatores nas variáveis estudadas.

Tabela 1. Análise de variância do percentual de regeneração, número de brotos emitidos, comprimento da maior brotação e número de folhas por ápice caulinar de jenipapeiro (*Genipa americana* L.), submetidos ao processo do encapsulamento-desidratação com posterior imersão em solução de sacarose por 24 ou 48 horas, seguido da desidratação em câmara de fluxo laminar (0, 2 e 4 horas).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Regeneração %	No de brotos emitidos	Comprimento da maior brotação (cm)	Número de folhas
Imersão (I)	1	2.268.648.150 ^{ns}	2554537 ^{**}	0.375000*	15041667 ^{**}
Desidratação (D)	2	20.252.317 ^{ns}	0.768404 ^{**}	0.207987 ^{ns}	12258229 ^{**}
I x D	2	263.273.150 ^{ns}	0.184537 ^{ns}	0.045338 ^{ns}	0.825904 ^{ns}
Resíduo	18	812.119.603	0.175538	0.098664	2.492.956
Total	23				
CV %		36.64	39.42	35.29	55.47

** Significativo a 0,01 de probabilidade; * Significativo a 0,05 de probabilidade; ns Não significativo.

A imersão dos explantes de jenipapeiro em solução de sacarose durante 24 horas proporcionou maiores resultados para número de brotos emitidos, comprimento da maior brotação e número de folhas/ ápice caulinar quando comparado com o tempo de 48 horas de imersão (Figuras 1, 2 e 3). Este resultado contrasta com o relatado por Santos (2004), na qual afirma que o nível de sacarose no meio

de pré-cultivo, assim como a duração da exposição do explante no meio, não influencia a recuperação após desidratação.

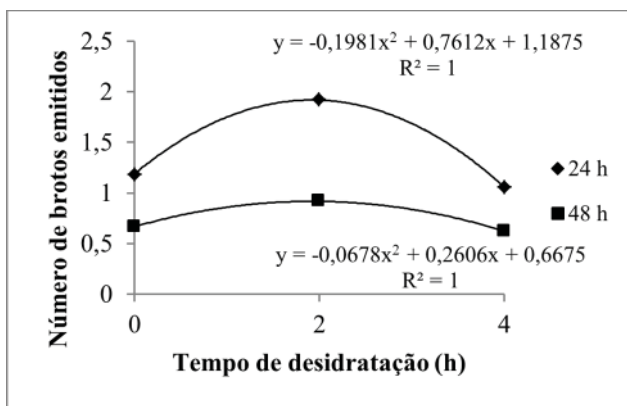


Figura 1. Número de brotos emitidos por ápices caulinares de jenipapeiro submetidos ao encapsulamento, em função do tempo de imersão (24 e 48 h) na solução crioprotetora e tempo de desidratação (0,2 e 4 h) em câmara de fluxo laminar.

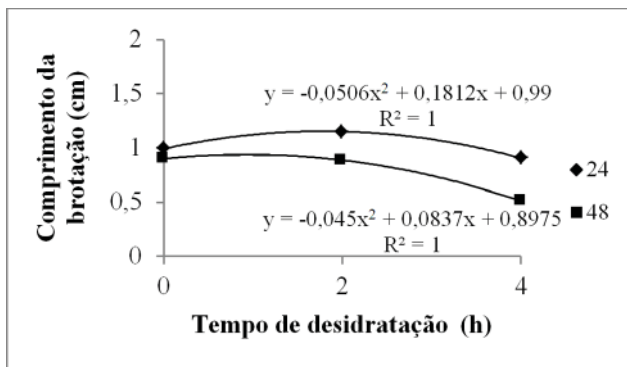


Figura 2. Comprimento da brotação obtida a partir de ápices caulinares de jenipapeiro submetidos ao encapsulamento, em função do tempo de imersão (24 e 48 h) na solução crioprotetora e tempo de desidratação em câmara de fluxo laminar (0,2 e 4 h).

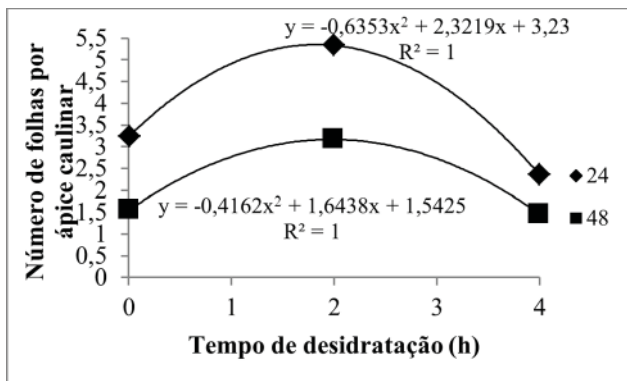


Figura 3. Número de folhas por ápices caulinares de jenipapeiro submetidos ao encapsulamento, em função do tempo de imersão (24 e 48 h) na solução crioprotetora e tempo de desidratação (0, 2 e 4 h) em câmara de fluxo laminar.

O maior número de brotos (2 brotos/ápice caulinar) foi obtido para ápices caulinares encapsulados e imersos por 24 horas na solução de sacarose com posterior desidratação por duas horas em câmara de fluxo laminar (Figura 1). Este valor foi superior ao encontrado por Lopes (2005) que obteve 0,90 brotos de ápices caulinares encapsulados de algodoeiro.

Houve um comportamento quadrático em função do tempo de desidratação para a variável comprimento da brotação, obtida de ápices caulinares encapsulados de jenipapeiro (Figura 2). O maior valor obtido (1,15 cm) ocorreu em 24 horas de imersão dos explantes na solução crioprotetor combinado com duas de desidratação em câmara de fluxo laminar. Estes tratamentos também promoveram o maior valor para variável número de folhas/ápice caulinar (5,33 folhas), conforme Figura 3.

A regeneração dos ápices caulinares não foi afetada pelo encapsulamento, ou seja, 100% dos ápices caulinares encapsulados (dados não apresentados), e imediatamente cultivados *in vitro*, regeneraram. Resultados semelhantes foram observados por Santos (2004) para germinação dos eixos embrionários encapsulados de *Citrus*. De acordo com Paulet e outros (1993), o encapsulamento protege a estrutura embebida e a torna resistente a tratamentos que poderiam ser letais.

Conclusões

A imersão em solução crioprotetora de 0,5 M sacarose e a desidratação em câmara de fluxo laminar não altera a viabilidade dos ápices caulinares de jenipapeiro encapsulados. A imersão por 24 horas em solução crioprotetora de 0,5 M sacarose e desidratação por 2 horas em câmara de fluxo laminar apresenta potencial para uso em futuros trabalhos protocolos de criopreservação.

Agradecimentos

A Embrapa e FAPITEC-SE pelo aporte de recursos financeiros e a CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

Referências

CARVALHO, P. E. R. **Jenipapeiro**. Colombo: Embrapa Florestas. 2003. 14 p. (Circular Técnica, 80).

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 57, p. 227-243, 1991.

LOPES, K. P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992. p. 302.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAULET, F.; ENGELMANN, F.; GLAZMANN, J. C. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Sacharum* sp.) hybrids using encapsulationdehydration. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, p. 525-529, 1993.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando encapsulamento e desidratação. Documento 115, p. 17, Brasília - DF, 2004.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, p. 70-84, 2000. Edição Especial.

SOLIMAN, H. I. A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apricot (*Prunus armeniaca* L.) using encapsulation-dehydration. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 12, n. 12, p. 1419-1430, 2013.

STUSHNOFF, C. Cryopreservation of apple genetic resources. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, p. 1151-1154, 1987.

VALERI, S. V.; PURETA, R.; CRUZ, M. C. P. Efeitos do fósforo do solo no desenvolvimento inicial de *Genipa americana* L. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 64, p. 69-77, 2003.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 14, p. 18-20, 2000.